Aus dem Robert-Koch-Institut
des Bundesgesundheitsamtes Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

METHODISCHE NACHWEISPROBLEME EINER PERSORPTIONSVIRÄMIE ALS MODELL ORALER IMMUNISIERUNG IM SELBSTVERSUCH

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Armin Siegfried Ludwig Büchner
aus Halle a. d. Saale

1974

Aus dem Robert-Koch-Institut
des Bundesgesundheitsamtes Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

METHODISCHE NACHWEISPROBLEME EINER PERSORPTIONSVIRÄMIE ALS MODELL ORALER IMMUNISIERUNG IM SELBSTVERSUCH

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Armin Siegfried Ludwig Büchner
aus Halle a. d. Saale

Referent: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Prof. Dr. med. Georg Henneberg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der

Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 6. Mai 1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

INHALT

		Seite
I.	Historische und grundsätzliche Ausführungen	4
	1. Fragen der lokalen, insbesondere oralen Infektion bzw. Immunisierung	5
	2. Das Phänomen der Persorption	9
II.	Material und Methoden	13
	1. Anzüchtung von E. coli B Genf	13
	2. Anzüchtung des Bakteriophagen T_3	14
	3. Bestimmung des Bakteriophagentiters	14
III.	Selbstversuche und zusätzliche serologische Ansätze	14
	1. Gewinnung eines Anti-Coli-Immunserums vom Kaninchen	17
	2. Bestimmung der nativen Hämagglutinin-Titer in verschiedenen Seren	17
	3. Absorptionsversuche	17
	4. Neutralisationstest	19
IV.	Diskussion der für den Fehlschlag wahrscheinlich verantwortlichen Faktoren	20
V.	Zusammenfassung	22
VI.	Literatur	24

I. Historische und grundsätzliche Ausführungen

Die Geschichte des Menschen ist auch eine Geschichte verheerender epidemischer Infektionskrankheiten wie Pest, Typhus, Cholera, Pocken etc., deren Genese in theistischen und animistischen Kulturen in der Strafe zorniger Götter und böser Dämonen gesucht wurde. Die Theorie der "Miasmen" und "Kontagien", die der Hippokratischen Medizin zugrunde liegt und bis ins 19. Jahrhundert hinein wirksam war, anerkannte bereits die Bedeutung der Umweltbedingungen im Krankheitsgeschehen, erfaßte empirisch Kontagiosität und zwischenmenschliche Übertragbarkeit solcher Krankheiten und wußte um eine "Feiung" nach überstandenem Leiden. Aber erst zu Zeiten, da LEEUWENHOEK das Lichtmikroskop entwickelte, waren die naturwissenschaftlich-technischen Voraussetzungen für deren Erkenntnis als von materiellen Mikroorganismen verursachte Krankheiten gegeben.

Die sich aus dieser Einsicht ergebende Forderung der Prävention durch hygienische und prophylaktische Maßnahmen erfuhr ihre Voraussetzungen in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts durch systematisierende mikrobiologische Grundlagenforschung. Sie ist mit Namen wie PASTEUR, KOCH, GAFFKY, LÖFFLER, PETTENKOFER und EHRLICH verbunden, um nur einige herausragende Persönlichkeiten zu nennen. Das Verständnis des Wesens der Infektionskrankheit als "Auseinandersetzung zwischen Makro- organismus und Mikroorganismus" und die Möglichkeit der kulturellen Reindarstellung ("Spezifitätslehre" Robert KOCH's) schufen endlich Raum für die Experimentalforschung im Tierversuch.

Erste Beobachtungen über die Möglichkeit von immenser epidemiologischer Bedeutung, Labortiere durch virulenzgeschwächte oder

inaktivierte Bakterienstämme oder deren Toxine gegen das Auftreten charakteristischer Krankheitssymptome zu impfen, wurden von PASTEUR, BEHRING, CALMETTE und GUÉRIN, EHRLICH, LÖFFLER, PFEIFFER, BUCHNER und anderen beschrieben. Diese Erfolge der lokalen und parenteralen, passiven und aktiven Immunisierung, die seit der Wende des 18. Jahrhunderts mit der Pocken-Vakzination in Europa als wirksamer Impfprophylaxe auch beim Menschen bekannt war, mußten lange Zeit reine Empirie bleiben. Der immunologischen und serologischen Forschung der letzten Jahrzehnte blieb es vorbehalten, unser Wissen über den Charakter zyklischer Infektionskrankheiten mit Organotropie des Erregers, über die unspezifische antitoxische und antimikrobielle Potenz des Blutes, die Induktion der spezifischen humoralen Immunglobulinsynthese auf Antigenreiz, die Penetrationsfähigkeit auch lokal applizierter Antigene u.a.m. zu begründen.

1. Fragen der lokalen, insbesondere oralen Infektion bzw. Immunisierung

Unser besonderes Interesse soll im Rahmen dieser Arbeit dem lokalen, insbesondere oralen Immunisierungsmodus und den dabei wirksamen Prinzipien gelten, der gegenüber der parenteralen Impfmethode eine Reihe wesentlicher Vorzüge hat wie praktisch fehlende Überdosierungs- und Provokationsgefahr, geringstes Komplikationsrisiko, massenhafte Durchführbarkeit im Katastrophenfall (RAETTIG, 22). Die Stationen auf dem Wege zur Oralimmunisierung im Tierversuch markierten PASTEUR (1880 Hühner gegen Anthrax), EHRLICH (1891 Mäuse gegen pflanzliche Proteine), WRIGHT (1904 Typhusimpfung), LÖFFLER (1906 Mäuse mit Salmonella typhi murium) und andere.

Während die parenterale Immunisierung einen antikörperstimulierenden Kontakt des intravenös, intramuskulär, sub- oder intrakutan injizierten Immunogens auf hämato- oder lymphogenem Wege mit den immunkompetenten Teilen des Retikulo-endothelialen Systems einleuchtend erscheinen läßt, sind wichtige Fragen des Penetrationsmechanismus von auf das intakte Integument oder die gastrointestinale oder tracheobronchiale Schleimhaut aufgebrachten Impfstoffen bis heute ungeklärt. Den Anstoß zur Untersuchung dieser Probleme gab METCHNIKOFF mit seiner Beobachtung der Phagozytose und der Annahme des Makrophagen als spezifischem zellulärem Reaktionssubstrat. Sein Schüler BESREDKA (2) baute 1918 auf Erfolgen mit Kaninchenimmunisierung gegen Dysenterieshigellen eine Theorie der "lokalen Immunität" auf, die schon 1905 WASSERMANN und CITRON (37) postuliert hatten. Sie basierte auf der Erfassung des Zusammenhangs zwischen vermutetem Eintrittsort des Krankheitserregers und bevorzugtem Manifestationsorgan der Symptomatik, im Falle der besonders untersuchten Enterobakteriazeen der Digestionstrakt. Eine solche zelluläre oder Gewebsimmunität würde sich in diesem Fall auf eine Immunantwort des Darmmukosaepithels beschränken, die Darreichungsform des Impfstoffes richtete sich ausschließlich nach der Lokalisation des Krankheitsprozesses. Dieser These einer lokalisierten Resistenzerhöhung widersprachen allerdings eine Reihe wichtiger Beobachtungen: Nach Mitteilungen von BRÜCKNER, LUMIÈRE und CHEVROTIER, REITER, IMRAHIM und anderen, die im Tierversuch oral und subkutan gegen Typhus impften, wurde auch nach parenteraler Infektion ein ausreichender Schutz vorgefunden. Es zeigte sich ferner, daß nicht nur mit enteropathogenen Keimen, sondern auch zum Beispiel mit pyogenen Kokken oral eine vorübergehende antiinfektiöse Immunität erreichbar ist (SCHLEWINSKI, 29). Schließlich gelang mittels serologischer Methoden

der Nachweis gegen Salmonella typhi gerichteter Agglutinine, die nach unseren Kenntnissen nur bei einem systemischen Kontakt mit dem Antigen auftreten. Zwar waren die Ergebnisse der Vielzahl zu diesem Thema erschienenen Veröffentlichungen nicht einheitlich, und es ließ sich keine eindeutige Korrelation zwischen aktuellem Antikörpertiter und Wirkungsgrad der Oralimmunisierung feststellen. Das maßgebliche Kriterium des Impferfolges aber ließ sogar eine teilweise Überlegenheit dieser Methode gegenüber der parenteralen erkennen. Den eindrucksvollsten Beitrag hierzu erbrachte RAETTIG anläßlich der Typhus-Paratyphus-Pandemie in Mecklenburg-Vorpommern 1945/47, als er anhand umfangreicher Felduntersuchungen belegen konnte, daß die Subkutanimpfung keinen signifikanten Schutz erzielte, die Morbidität durch die Oralimpfung aber auf ein Drittel gesenkt werden konnte. Die mittlerweile fundierte klinisch-epidemiologische Erfahrung, die man insbesondere mit der Typhus- und Poliomyelitis-Schluckimpfung seit einigen Jahrzehnten hat, berechtigt zu der Feststellung, daß bei ungleich geringerer Komplikationsrate eine zumindest gleichwertige Krankheitsimmunität erreichbar ist.

Man ist heute übereinstimmend der Auffassung, daß bei jedem entzündlichen Infektionsgeschehen eine ganze Kette mesenchymaler und humoraler, lokaler und systemischer, antigenspezifischer und unspezifischer Abwehrmechanismen des Makroorganismus ineinandergreifen. Sie reichen von der Phagozytose durch Granulozyten, Mono- und Histiozyten über die Wirkung des Komplementsystems, bestimmter Bakteriolysine bzw. -cidine, Properdin, Opsonine, Interferon als normalen Serumkomponenten im Rahmen der spezieseigenen Resistenz bis zur Synthese hochantigenspezifischer Agglu-

tinine, Lysine und Präzipitine als besonderer Potenz der immunkompetenten Plasmazellen (EHRLICH, 6, 7). Sicher werden diese komplexen zellulären und humoralen, eventuell nervalen Leistungen des Organismus auch bei der aktiven Immunisierung, auf welchem Wege auch immer erreicht, ingang gesetzt. Man könnte diese allgemein als eine subklinisch verlaufende artefizielle Infektsetzung zwecks Stimulation der genannten Systeme definieren, deren Reaktion sich anläßlich einer homologen oder antigenverwandten Belastung anamnestisch wiederholen soll. Es sei hier die interessante These erwähnt, daß phagozytiertes Antigen im Sinne einer Endobiose (HÖRING) intrazellulär konserviert wird, um eine Strukturkopie bzw. genetisches Material an eine "memory cells" genannte Population kleiner Lymphozyten weiterzugeben. Bei homologem Zweitkontakt wird das lymphoretikuläre System entweder durch deren Transformation über Immunoblasten in Plasmazellen zur Synthese spezifischer γ-Globuline veranlaßt (Booster-Effekt), oder aber es setzt eine Differenzierung in Immunozyten ein, die für die zelluläre Reaktion vom Spättyp verantwortlich sind (Klon-Selektionstheorie nach BURNET). Ob im Falle der natürlichen Infizierung, der präventiven lokalen Impfstoffanwendung oder der Aufrechterhaltung eines Grundimmunitätsspektrums durch unbemerkte kontinuierliche "Dreckimmunisierung" (RAETTIG) - immer stellt sich die Frage nach dem eigentlichen Immigrationsmechanismus des infektiösen oder immunogenen Agens. Einsichtig erscheint dieser bei Protozoen und Parasiten, die zu aktiver Gewebsinvasion befähigt sind, bei Bakterien vom Typ des Mycobacterium tuberculosis oder Treponema pallidum, die durch entzündlich-nekrotisierende Prozesse (Primäraffekt) das Integument durchdringen, bei Viren, die durch zytopathogene Effekte mit folgender Epithelläsion Zugang zum Blut- und Lymphgefäßsystem erhalten oder schließlich

Erreger, die durch bereits bestehende Schleimhautdefekte die Epithelbarriere umgehen können. Bei den meist avirulente Keime oder Bakterienfraktionen enthaltenden Oralimpfstoffen, die im allgemeinen auf die intakte Schleimhaut treffen, ist aber mit diesen Immigrationsvorgängen nicht zu rechnen. Darüberhinaus würde man nach konventioneller Kenntnis des Digestionsvorganges erwarten, daß zumindest inaktivierte Mikrobien oder deren Ektotoxine und Aggressine nach Resorption und Phagozytose intrazellulär durch Lysozyme, Kathepsin und andere Wirkstoffe ihre antigene Struktur verlören, sofern sie nicht bereits im Darmlumen dem enzymatischen Abbau oder der Wirkung sogenannter Koproantikörper (KOSHLAND,7) anheimfielen.

2. Das Phänomen der Persorption

Einen bemerkenswerten Beitrag zur Klärung dieser Fragen leistete VOLKHEIMER mit der systematischen Erfassung von Beobachtungen, die schon 1843 von HERBST beschrieben und später von einer Reihe anderer Autoren wie HIRSCH und VERZÁR bestätigt wurden, wegen ihrer Unglaubwürdigkeit aber in Vergessenheit geraten waren. Der nach seinem Erstbeschreiber so genannte HERBST-Effekt ist folgendermaßen charakterisierbar: Es handelt sich um eine p a r a zelluläre Immigration großkorpuskulärer Chymusbestandteile, vornehmlich in den Bereichen des Gastrointestinaltraktes, die von einschichtigem Zylinderepithel gedeckt sind, also zwischen Cardia und Rektum. Dieser von VOLKHEIMER als Persorption bezeichnete, rein mechanisch-funktionelle Vorgang ist abhängig von der Intensität der Motorik der Muscularis mucosae, der Konsistenz und der Größe

des Partikels. Anhand umfangreichen Materials an histologischen Präparaten konnte tierexperimentell nachgewiesen werden, daß regelmäßig verfütterte Partikel bis zu Durchmessern von zirka 75, maximal 120 µ , bevorzugt im Bereich der Desquamationszone des Dünndarm-Mauserepithels zwischen den Zellgrenzen hindurch in das Stroma "eingeknetet" werden. Es ist zu betonen, daß eine transzelluläre passive Diffusion oder aktive Resorptionsleistung der Epithelzelle sich auf echte Lösungen, also die molekulardisperse Phase (maximal 4 Å) beschränkt, während Cytopempsis (Mikropinocytose) nur in Größenordnungen bis zu 200 Å möglich ist. Als Modellkörper wurden verschiedene Stärkesorten wie Kartoffel-, Mais- und Weizenstärke, Pollen, Lycopodiumsporen, Diatomeen, PVC-Kügelchen, Kristalle verschiedener Art, aber auch Muskelzellbruchstücke, Hefen, ja sogar Askariden- und Cestodeneier persorbiert. Der Abtransport dieser embolisierungsfähigen Korpuskeln verläuft teils chylös über das Lymphdrainagesystem via Ductus thoracicus in die obere Hohlvene, teils über die Mesenterialvenen zur Vena portae. Die quantitative Erfassung des Persorptionsphänomens ergab eine in weiten Grenzen gültige Unabhängigkeit (Faktor 20) der im peripheren Blut vorgefundenen Partikelzahl von der zugeführten Substanzmenge. Andererseits war die Persorptionsrate aber durch Parasympathikomimetika, Coffein, Nikotin, Prostigmin und andere die Darm- und Zottenmotorik stimulierende Pharmaka zu beeinflussen. Die Kinetik dieses Vorgangs ließ sich in einem charakteristischen Diagramm erfassen mit einem Anstieg nach wenigen Minuten, einem Maximum bei zirka 60 Minuten und einem Abfall nach etwa 8 Stunden zum Nullpunkt. Die Beobachtung der enteralen Aufnahme von Partikeln weit im Mikron- Größenbereich widersprach also den gültigen Anschauungen über die Verdauungsphysiologie.

In peripheren Gefäßgebieten ließen sich Mikroembolisierungen der terminalen Parenchymstrombahn nachweisen, Ereignisse, denen angesichts der physiologischen Normalität dieses Geschehens keine allzu große humanpathogenetische Bedeutung zukommen dürfte (Kollateralen, Rekanalisation), die aber zum Beispiel in der Allergologie oder in der Gerontologie als Ursache zerebraler Mikroinfarkte durchaus von Interesse sein könnten ('Silting-Effekt'). Für die Elimination persorbierter Partikel aus dem zirkulierenden Blut sind prinzipiell alle physiologischen Exkretionswege gangbar, die neben Phagozytose und intravasalem enzymatischem Abbau auch beschritten werden. So konnte man das Auftreten von Partikeln zum Beispiel im Harn (HIRSCH-Effekt), im Speichel, in der Milch und in der Galle beobachten, ja selbst eine diaplazentare Passage wurde neben dem Übertritt in den Liquor cerebrospinalis und die präformierten Körperhöhlen festgestellt.

Neben der Vielzahl an Fragen, die diese von VOLKHEIMER und Mitarbeitern auch an freiwilligen Versuchspersonen erhobenen Befunde aufwerfen, interessiert hier besonders die Feststellung, daß die epithelialen, mesothelialen und endothelialen Grenzflächen und physiologischen Membranen auch des menschlichen Organismus für korpuskuläre Elemente so impermeabel nicht sind, sondern daß ein Austausch zwischen allen Körperkompartimenten prinzipiell möglich ist. Das soll in Zusammenhang mit unserer Fragestellung heißen, daß auch für den Wirkungsmechanismus der oralen Infektion oder aktiven Immunisierung mit antigenem Material der Persorptionsvorgang als mögliches wirksames Prinzip sich anbietet. Wie erwähnt, wurden diese Vorgänge auch am menschlichen Probanden nicht nur mit relativ inerten normalen Nahrungsbestandteilen und Bäckerhefe (VOLKHEIMER et al., 33), sondern sogar mit der fakultativ patho-

genen vermehrungsfähigen Hefe Candida albicans (KRAUSE, MATHEIS und WULF, 19) versucht, ein Vorgehen, das doch erhebliche Risiken in sich trägt.

Daß die Schleimhaut des Intestinaltraktes für Viren ohne Aktivitätsverlust permeabel ist wurde insbesondere im Mäuseexperiment nachgewiesen (KELLER, 17 , HOFFMANN, 14, und andere). Vergleichende Untersuchungen mit dem an Mäuse verfütterten Bakteriophagen T_3 von Escherichia coli B und dem mäuseenteropathogenen Parapoliomyelitisvirus Columbia SK (RAETTIG, 20, 22) ergaben ein Auftreten beider Virusarten im Blut nach etwa 15 Minuten. Während für den Phagen infolge seiner Wirtsspezifität ein intrazellulärer Vermehrungszyklus von vornherein auszuschließen ist, kommt auch für das zytopathogene Columbia SK-Virus ein Generalisationsstadium angesichts der kurzen Zeitspanne nicht in Betracht. RAETTIG prägte hierfür als Gegensatz zur Infektionsvirämie den Begriff der Persorptionsvirämie. HOFFMANN (14) stellte in analogen Versuchen schon nach wenigen Minuten Phagen im Blut von zirka 20 % des untersuchten Mäusekollektivs bei Ösophagussondierung fest mit einem Titermaximum nach etwa 30 Minuten und Abfall zur Nullinie nach einigen Stunden. Allerdings ergab sich eine beträchtliche individuelle Streubreite, und vergleichende tracheale und rektale Applikation führte zu deutlich höheren und schneller ansteigenden Virämietitern. Dies beweist die These von der prinzipiellen Durchlässigkeit aller intakten Schleimhäute und epithelialen Grenzflächen des Organismus auch unabhängig von der beschriebenen gastrointestinalen Persorption und ebenfalls im Sinne einer Sekretion (SAHM, 28). SCHLEWINSKI et al. (29) konnten die von RAETTIG entworfene typische Normkurve der Persorptionsvirämie bestätigen (wenn auch mit einem etwas verzögerten Maximum), die große Ähnlichkeit mit der von VOLKHEIMER

gefundenen Persorptionskinetik zeigt. Außerdem bestärkten sie dessen Beobachtung, daß nur eine lockere Korrelation zwischen der angebotenen Dosis und der Höhe des Korpuskeltiters besteht. Schließlich berichteten die genannten Autoren übereinstimmend über eine auffällige Anreicherung in den Speicheldrüsen, die den von RAETTIG formulierten "Kreislauf der Antigene" schließt, sowie in Organen des RES (Milz, Leber), wo nach Antigenstimulus eine rasche Inaktivierung stattfinden dürfte.

Die skizzierte Problematik und die im Tier- und zum Teil auch im Humanexperiment erhobenen Befunde gestatten den Analogieschluß, daß auch beim Menschen die besagte Persorptionsvirämie bzw.-bakteriämie ein normaler Vorgang in der Immunogenese sein müßte. Um in diesen Fragen einen Schritt weiter zu kommen, habe ich mich bereitgefunden, im Selbstversuch einen antigenen, aber apathogenen Mikoorganismus oral aufzunehmen, um ihn im Falle des Erscheinens im peripheren Blut kulturell nachzuweisen. Als Modellkörper schien uns der Escherichia-coli-Phage T_3 geeignet.

II. Material und Methoden

1. Anzüchtung von E.coli B Genf

Sterile Pepton-Bouillon wurde mit dem Stamm E.coli B Genf beimpft, 2 1/2 Stunden bei 37°C inkubiert, durch ein Membranfilter MF 14 Porengröße 0,6 /u mit Hilfe einer Saugflasche abfiltriert und der Bakterienrückstand mit je 5 ml Sautonlösung (Glycerin-Glukose-Zusatz) dreimal gewaschen.

2. Anzüchtung des Bakteriophagen T_3

Aufschwemmung des gewonnenen Bakterienmaterials in einer Waschflasche mit 200 ml Sautonlösung unter ständiger Belüftung bei 37°C. Nach Erreichung einer approximativen Bakteriendichte von 5 x 10^7/ml Zugabe von 2 ml Bakteriophagenlösung (1,4 x 10^9/ml), die nach 1 1/2 Stunde durch Schaumbildung und Klärung der trüben Bakterien-Phagen-Suspension Vermehrung und Lyse anzeigte. Zelldetritus wurde mittels MF 14-Membranfilter Porengröße 0,1 µ entfernt, das Filtrat enthielt den T_3-Phagen mit filtergängigen Bakterienproteiden und -polysacchariden. Eine weitgehende Reindarstellung und Konzentration wurde durch mehrmaliges Waschen und schließlich Suspendieren in m/15 Phosphatpuffer (pH 7,4) erreicht.

3. Bestimmung des Bakteriophagentiters

Die Bakteriophagenplaquezählung und Titererrechnung erfolgte auf Blauplatten (Wasserblau-Dextrose-Bouillon-Agar) mit in der Wachstumsphase befindlichem Colirasen, die mit je 0,3 ml der Phagenlösung in Zehnerverdünnungsstufen beschickt wurden. Nach Inkubation und Plaquezählung ergab sich für die Stammsuspension eine mittlere Phagendichte von 1,4 x 10^9/ml.

III. Selbstversuche und zusätzliche serologische Ansätze

A) Um der sofortigen Inaktivierung der Phagen durch die natürliche Magensaftazidität zu begegnen (HEICKEN und SPICHER, 12), nahm ich am Versuchstag morgens nüchtern 75 ml einer 0,15 molaren $NaHCO_3$-Lösung zwecks Neutralisation zu mir, es folgte die Entnahme der ersten Blutprobe aus einer in der Vena cubitalis liegenden

Flügelkanüle als Leerwert. Anschließend trank ich 50 ml der T_3-Phagensuspension, die bei einem (nach mehrmaliger Auszählung ermittelten) Titer von 2 x 10^8/ml einer insgesamt inkorporierten Dosis von zirka 1 x 10^{10} Phagen entsprach. Die Gewinnung der Blutproben à 2,5 ml erfolgte nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 Minuten, jeweils in 2,25 ml physiologischer NaCl-Lösung und versetzt mit 0,25 ml 3,8 %igem Natrium citricum als Antikoagulans. Von diesem Ansatz wurde in der üblichen Weise eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen angelegt, aus jeder Charge wurden 0,5 ml in die Petrischalen überführt und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die exakte tabellarische oder diagrammatische Aufstellung der Daten hätte wenig Informationswert, denn die Plaquezählung am nächsten Morgen verlief bei allen Platten und Verdünnungsstufen negativ, es hatte also keine Phagenvermehrung und Bakteriolyse stattgefunden.

B) Da die Technik der Säureabpufferung durch Natriumbikarbonat quantitativ unzuverlässig erschien, entschlossen wir uns, den Versuch unter etwas modifizierten Bedingungen einige Wochen später zu wiederholen. Diesmal erreichten wir die Umgehung des aktivitätsvermindernden Magenmilieus durch das Legen einer Duodenalsonde. Prinzipiell verfuhren wir in der beschriebenen Weise, nur erhöhten wir die applizierte Phagenmenge um den Faktor 10 auf etwa 1,3 x 10^{11}. Außerdem wurde diesmal nicht auf Colirasen ausgespatelt, sondern 1 ml pro Blutprobe wurde mit 1 ml frischer Coli-Bouillon-Kultur versetzt, um wie üblich auf Wasserblau-Dextrose-Agar zu inkubieren. Bei der Mischung mit dem Vollblut kam es zu einer makroskopisch sichtbaren Agglutination. Die anschließende Bebrütung über Nacht erbrachte wiederum weder auf den Platten noch im diesmal parallel laufenden Röhrchentest Phagenvermehrung mit

Plaquebildung beziehungsweise Klärung der Suspension.

Dieses etwas enttäuschende Ergebnis ist sicherlich relativierbar in der Feststellung, daß eine ein- (oder zwei-) malige negative experimentelle Beobachtung am Individuum gewiß keine statistisch relevante Aussage erlaubt, angesichts der Tatsache, daß auch im Tierversuch an großen Kollektiven eine Persorptionsvirämie nur in wechselnd geringen Prozentsätzen nachgewiesen wurde. Dem steht hier die Schwierigkeit entgegen, eine genügend große Zahl an freiwilligen Probanden zu finden, wobei das Prinzip anhand anderer Modellkörper auch beim Menschen als gesichert gelten darf. Hinzu kommen durch den indirekten kulturellen Nachweis mit reaktiven Substraten eine Vielzahl von Parametern, die nur durch umfangreiche zusätzliche experimentalmethodische und serologische Versuchsansätze abgeklärt werden können.

Wegweisend bei den nun folgenden serologischen Überlegungen und Zusatzuntersuchungen war das bemerkenswerte Ereignis der Agglutination beim Austitrieren, die wir als kombinierte Bakterien- und Hämagglutination interpretieren. Unter Bezugnahme auf PETTENKOFER, MAASSEN und BICKERICH (20), die eine Antigengemeinschaft zwischen bestimmten Enterobakteriaceen und den menschlichen Blutgruppensubstanzen A und B festgestellt hatten (und an anderer Stelle sogar die Induktion der normalen Isoantikörper durch Darmbesiedlung mit Coli-Flora beim Säugling wahrscheinlich gemacht hatten), schien eine agglutinierende Reaktion zwischen E.coli B und den in meinem O-Serum enthaltenen kompletten Isoagglutininen Anti-A und Anti-B neben anderen Seroreaktionen denkbar. Wir hielten es in dieser Situation für sinnvoll, nach Herstellung eines Kaninchen-Anti-Coli-Serums mit Hilfe eines Absorptionsversuchs die Frage zu verfolgen, ob die Bakterienagglutination in vitro die Phagenvermehrung verhindert haben könnte.

1. Gewinnung eines Anti-Coli-Immunserums vom Kaninchen

Neun Kaninchen (von denen fünf sich als der serologischen Gruppe Anti-A, vier als der Gruppe A zugehörig erwiesen), wurde nach dem von PETTENKOFER, MAASSEN und BICKERICH beschriebenen Verfahren Coli-Sautonsuspension (0,5 ml à 5 x 10^7/ml pro Woche) in die Ohrvene injiziert. Besonders die Anti-A-Tiere erwiesen sich als ausgesprochen empfindlich und verstarben zum Teil im Endotoxinschock, auch nachdem wir die Dosis und Frequenz um die Hälfte reduzierten. Das Serum des letzten A-Tieres, das nach der dritten Injektion entblutet wurde, zeigte, auf dem Objektträger in NaCl-Lösung geometrisch verdünnt, Spontanagglutination mit Coli-B bei einem Titer von 1:262144 und nach Widal einen Titer von 1:2048.

2. Bestimmung der nativen Hämagglutinin-Titer in verschiedenen Seren

Das Kaninchen-Immunserum wurde in geometrischer Reihe verdünnt und auf Lauerplättchen gegen eine 6 - 8%ige O-, A_1- und B-Erythrozytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung angesetzt. Gleichermaßen verfuhren wir mit meinem Nativserum sowie Spenderseren der Blutgruppen O, A und B.

3. Absorptionsversuche

Kaninchenserum und Coli-Suspension von 10^9 Keimen pro ml Sautonlösung zu gleichen Teilen wurden 4 Stunden bei Zimmertemperatur und 20 Stunden im Kühlschrank bei 6^oC gehalten. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand (Coli-absorbiertes Anti-Coli-Serum) in NaCl-Lösung geometrisch verdünnt und auf Lauerplättchen gegen eine 6 - 8%ige O-, A_1- und B-Erythrozytensuspension in NaCl angesetzt.

Vergleichend bestimmten wir ebenso die Isoagglutinintiter in meinem Versuchsserum sowie in Spenderserum der Gruppen O, A und B nach Absorption an Coli B.

SERA		BLUTGRUPPE	NATIV	NACH ABSORPTION AN E.COLI B
Proband	0	(Anti-A, Anti-B)	1:32/1:64	1:16/1:16
Blutspender	0	(Anti-A, Anti-B)	1:4/1:2	1:4 -
Blutspender	A	(Anti-B)	1:4	--
Blutspender	B	(Anti-A)	1:2	--
Kaninchen-Immun		(Anti-A, Anti-B)	1:2/1:4	--

Dieses Ergebnis zeigt eine deutliche Reduktion oder gar den Verlust der nativen Isoantikörpertiter sämtlicher Sera nach Absorption an den von uns verwendeten Coli-Stamm und gestattet den Schluß einer Antigengemeinschaft zwischen Coli-Zellwandantigen und menschlichem Erythrozyten-Agglutinogen im Sinne der genannten Autoren. Ob allerdings die von uns beobachtete Mischagglutination beim kulturellen Phagennachweis tatsächlich für das Ausbleiben der Phagenvermehrung verantwortlich war (möglicherweise durch Blockierung der Rezeptoren auf der Bakterienwand oder anderweitige Behinderung der zyklischen Vermehrung und Lyse) muß dahingestellt bleiben, da offen blieb, ob der Phage die Kultur virulent erreicht hat. Es schien uns im Hinblick hierauf untersuchenswert, ob ein präformierter oder durch den sensibilisierenden Erstkontakt induzierter, gegen T_3 gerichteter Antikörper in vivo phagenneutralisierend gewirkt haben könnte.

4. Neutralisationstest

Probandenserum wurde 30 Minuten bei 56°C inaktiviert und zu gleichen Teilen mit einer T_3-Phagensuspension (1,1 x 10^9/ml) in Sauton versetzt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und in Dezimalverdünnungsstufen auf Blauplatten-Colirasen austitriert. Ebenso verfuhren wir mit AB-Spenderserum, dem Kaninchenimmunserum und als Kontrolle Sautonlösung und steriler Bouillon, jeweils sowohl nativ als auch in der beschriebenen Weise gegen Coli absorbiert. Es zeigte sich in der Kontrolle ein um den Faktor 2 stärkeres Phagenwachstum als in meinem Serum, was für einen geringen Anti-Phagen-Titer spricht. Allerdings wird die Kompetenz unspezifischer Serumkomponenten gegenüber der spezifischen Immunneutralisation hiermit nicht erfaßt. Ferner trat bei meinem Coli-absorbierten Serum noch bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} totale Lyse ein gegenüber 10^{-4} im Nativserum, womit wir unsere These der inhibierenden Antikörperwirkung qua Antigengemeinschaft bestätigt sahen. Aber auch hier war eine Unterscheidung der Verantwortlichkeit von background-Antikörpern, Isoagglutininen und spezifischen Colibakterien-Agglutininen, deren Titer mit 1:8 ermittelt wurde, nicht eindeutig möglich. Es wäre sicher sinnvoll gewesen, Anti-Coli- und Anti-Phagen-Antikörper auch vor dem Versuch zu bestimmen, um aus Titerbewegungen auf eventuell stattgehabte Immunreaktionen schließen zu können. Da wir bei der Untersuchung des rein funktionellen Vorgangs einer Persorptionsvirämie immunologisch-serologische Prozesse nicht berücksichtigt hatten, erhielten wir keine signifikanten Hinweise, die über das Schicksal des inkorporierten Phagen verläßlich hätten Auskunft geben können. Es bleibt also, die genannten und weitere mögliche Fehlerquellen, die den Rahmen des experimentell Erfaßbaren gesprengt hätten, nach ihrer wahrscheinlichen Bedeutung weitgehend spekulativ zu diskutieren.

IV. Diskussion der für den Fehlschlag wahrscheinlich verantwortlichen Faktoren

1. Es wäre zumindest im ersten Versuch eine teilweise Säuredenaturierung der Phagen mit Aktivitätsverlust im Magen trotz Ruhesekretion und trotz des Bikarbonatpuffers nicht auszuschließen.

2. Besonders die denaturierten Phagen dürften rasch der Digestion durch Magen- und Pankreasenzyme anheimgefallen sein.

3. Unspezifische elektrostatische Adsorption eines Teils der Phagen an Zellmembranen, Grenzflächen oder Polyelektrolyte des Darminhalts ist denkbar (KELLER und ZATZMANN, 17).

4. Spezifische Adsorption an die Rezeptoren empfindlicher Colistämme der Bakterienflora im unteren Ileum, die aber auch Vermehrungszyklen ingang gesetzt haben könnte, wäre möglich.

5. Es fehlen quantitative experimentelle Daten für die Persorptionsrate beim Menschen, die sich aus Tierversuchen beispielsweise über das Körpergewicht, resorptionsaktive Oberfläche des Gastrointestinaltraktes oder ähnliches nicht rückschließen läßt und darüberhinaus einer beträchtlichen individuellen Streuung unterliegt. Ferner gibt es keine verläßlichen Angaben über die Persorptionskinetik dieses speziellen Modellpartikels in seiner Dimension (ca. 200 Å), Konsistenz und seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften, sodaß die Dosierung und damit der Phagentiter im Blut als zu niedrig angesehen werden könnte.

6. Falls eine Immigration aus dem Darmlumen stattfand, würde die viruzide Potenz der Körpersäfte in Form der Phagozytose oder des Properdinsystems (SULKIN, FINKELSTEINER und ROSENBLUM, 31),

Interferon und anderer background-Antikörper wie auch der enzymatische Abbau rasch wirksam werden.

7. Insbesondere beim zweiten Kontakt anläßlich des Wiederholungsversuchs ist an eine spezifische Neutralisation durch Phagen-Antikörper zu denken, wobei letztere auch normalerweise nicht auszuschließen sind. Der aus diesem Grunde angesetzte Neutralisationstest konnte einen geringfügigen Anti-Phagen-Titer ermitteln.

8. Selbstverständlich ist auch intravasal wie interstitiell mit einer unspezifischen Adsorption an Membranen (z. B, Erythrozyten), Kollagen oder elektrostatischen Bindung an als Polyelektrolyte wirkende Mucopolysaccharide wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat u.a. zu rechnen (KELLER und ZATZMANN, 17).

9. Schließlich kann, wie bereits ausgeführt, die Agglutination in den Petrischalen eine regelrechte Phagenvermehrung und Lyse verhindert und damit den Nachweis unmöglich gemacht haben.

Die Interferenzen infolge der beschriebenen Antigengemeinschaft hätten sich wahrscheinlich durch eine Versuchsperson vom AB-Blutgruppenphänotyp, die frei von Isoagglutininen ist, verhindern lassen. Des weiteren zogen wir in Erwägung, den erfolgreichen Experimenten mit Labormäusen zunächst entsprechende Untersuchungen an höheren Säugern folgen zu lassen, zum Beispiel am Schwein, das große physiologische Ähnlichkeit mit der menschlichen Spezies zeigt. Wahrscheinlich würde sich auch ein direkt kulturell, serologisch oder mikroskopisch nachweisbarer apathogener Mikroorganismus für eine experimentelle Persorptionsbakteriämie, -fungiämie oder -virämie als geeigneter erweisen. Schließlich könnte der nichtkulturelle Nachweis inerter Modellpartikel vermittels (elektronen-) mikroskopischer Methoden oder Tracertechniken (Radioisotopenmarkierung des

Immunogens, Immunfluoreszenz) eine Reihe nicht überschaubarer Größen ausschließen.

Ich möchte abschließend noch einmal betonen, daß unsere konkrete Fragestellung tatsächlich nur eine qualitative Alternativaussage erbringen konnte. Bakteriophagennachweis im Blut durch Plaquebildung in vitro hätte unter korrekten Versuchsbedingungen die Möglichkeit der Persorptionsvirämie beim Menschen verifiziert. Ein negatives Resultat im isolierten Versuch erlaubt aber noch keine gültige Aussage über die Wertigkeit der genannten komplexen Parameter, die Interpretierbarkeit und Relevanz der Ergebnisse und die Validität der Methoden, für deren Prämisse die auffindbare Literatur nicht sehr ergiebig war. Eine quantitative Aussage ist nur durch Erfassung eines größeren Kollektivs möglich, wogegen bei dieser Fragestellung die unmittelbar fehlende therapeutische Indikation im Menschenversuch steht. Es ist allerdings zu fragen, ob die experimentelle Ergründung von Wirkungsprinzipien der lokalen Immunisierung, die weitere Auskünfte über optimale Impfstoffdosierung, Verfahren zur Verbesserung der Penetrationsrate, Erhöhung der effektiven Immunogenität durch Präparation und Adjuvantien, Wahl der günstigsten Applikationsroute u.a.m. versprächen, angesichts ihrer enormen gesundheitspolitisch-epidemiologischen Bedeutung einigen innovativen Aufwand nicht wert wären.

V. Zusammenfassung

Meine Aufgabe war es, durch orale Inkorporation einer Suspension des Escherichia-coli-Phagen T_3 eine Persorptionsvirämie, die seit längerer Zeit aus Tierversuchen bekannt ist, im Selbstversuch am

Menschen nachzuweisen und damit ein Modell für den oralen Immunisierungsmechanimus zu schaffen. Da der kulturelle Nachweis des Phagen scheiterte, gelang es nicht, schlüssiges über sein Schicksal im Organismus auszusagen.
Es wurde versucht, die wahrscheinlichen Störgrößen zu eruieren, bzw. nach ihrer Bedeutung zu diskutieren; experimentalmethodische Vorschläge zu deren Umgehung wurden gemacht.

VI. Literatur

1. ADAMS, M.H.: Bacteriophages
Interscience Publ., New York 1959

2. BESREDKA, A.: Die lokale Immunisierung
A. Barth, Leipzig, 1926

3. BREUEL, H.P.: Lokale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
Literaturdokum. Reihe H, F. Gustav-Fischer Verlag, Suttg. 1969

4. BRÜCKNER, G.: Über orale Immunisierungsversuche
Zschr.f.Immunforschg. 8, 439 (1911)

5. ELBERG, S.S.: Cellular Immunity
Bact. Rev. 24, 67 (1960)

6. EHRICH , W.E.: Die zellulären Bildungsstätten der Antikörper
Klin. Wschr. 33, 315, (1955)

7. EHRICH , W.E.: Morphologie und Physiologie der Antikörperbildung
Verh. Deutsch. Ges. Path. 46, 10 (1962)

8. EHRLICH, P.: Experimentelle Untersuchungen über Immunität
Dtsch. Med. Wschr. 17, 976 (1891)

9. FUNK, J.: Tierversuche zur oralen Impfung mit hitzeinaktivierten Fungi (Candida albicans)
Inaug. Diss. FU Berlin 1969

10. GAY, F.P.: On Local and General Immunity
Journ. Immunol. 8, 1 (1923)

11. HAUROWITZ, F.: Die Art und Bildung von Antikörpern
Zbl. f. Bakt. Orig. 184, 318 (1962)

12. HEICKEN, K., SPICHER, G.: Über die Kinetik der Inaktivierung und Reaktivierung von Phagen
Zbl. Bakt. I Orig. 175, 321 (1959)

13. HILDEBRAND, G., WOLOCHOW, H.: Translocation of Bacteriophage across the Intestinal Wall of the Rat
Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 109, 183 (1962)

14. HOFFMANN, M.: Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsvirämie von T_3-Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 198, 371 (1965)

15. KÖHLER, H., SPRINGER, D.: Isolierung von phagozytiertem Virus aus Leukozyten infizierter Tiere
Zbl. f. Bakt. I Orig. 186, 287 (1962)

16. KELLER, R.: Passage of Bacteriophage Particles through Intact Skin of Mice
Science 128, 718 (1958)

17. KELLER, R., ZATZMANN, M.: Fate of Bacteriophage Particles Introduced into Mice by Various Routes
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 98, 577 (1958)

18. KELLER, R., ENGLEY, F.: Studies on the Factors Concerned in the Disappearance of Bacteriophage Particles from the Animal Body
Journ. Immunol. 83, 167 (1959)

19. KRAUSE, W., MATHEIS, H., WULF, K.:
Experimentelle Fungiämie und Fungiurie durch orale Verabreichung großer Mengen von Candida albicans bei gesunden Menschen (Selbstversuch)
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 85 (1969)

20. PETTENKOFER, H.J., MAASSEN, W., BICKERICH, R.:
Antigengemeinschaften zwischen menschlichen Blutgruppen und Enterobacteriaceen
Zschr. f. Immunforschg., 119, (1960)

21. RAETTIG, H.: Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus
Zbl. Bakt. I. Orig. 191, 97 (1963)

22. RAETTIG, H.: Erfahrungen und vergleichende Betrachtungen über die Erfolge der parenteralen und peroralen Typhusschutzimpfung
Zschr. f. Immunforschg. 108, 165 (1950)

23. RAETTIG, H.: Tierexperimente zur Resorptionsvirämie
Zbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 192, 534 (1964)

24. RAETTIG, H.: Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung
Wien. med. Wschr. 115, 33 (1965)
Zbl. f. Bakt. I Abt. Ref. 201, 291 (1966)

25. RAETTIG, H.: Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr)
Zbl. f. Bakt. I Ref. 183, 1 (1963)

26. RAETTIG, H.: Typhusimmunität und Schutzimpfung
Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1952

27. REPLOH, H., OTTE, H.: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttg. 1968

28. SAHM, E.: Sekretion von T_3-Phagen als Modellvirus in den Magen der Maus nach intravenöser Injektion
Inaug. Diss. Berlin 1968

29. SCHLEWINSKI, E.: Bakteriämie nach enteraler Persorption von Staphylokokken und vergleichende lokale Immunisierung mit inaktiv. Antigen
Inaug. Diss. Berlin 1970

30. SCHLEWINSKI, E., GRABEN, N., FUNK, J., SAHM, E., RAETTIG, H.: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen 13. Mitteilung: Persorption und Sekretion von Mikroorganismen im Tierversuch
Zbl. f. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 218, 93 (1971)

31. SULKIN, S., FINKELSTEINER, R., ROSENBLUM, E.: Effect of Zymosan on Bacteriophage Clearance
Science 125, 742 (1967)

32. VOLKHEIMER, G. et al.: Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente (Herbst-Eff.)
Zschr. f. Gastroenterol. 2, 57 (1964)

33. VOLKHEIMER, G. et al.: Über Resorption und Ausscheidung von intakten Hefezellen
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 192, 121 (1964)

34. VOLKHEIMER, G.: Beobachtungen zum Persorptionsmechanismus
Path. Microbiol. 31, 51 (1968)

35. VOLKHEIMER, G.: Gefäßsystem und Resorption
Münch. med. Wschr. 107, 2293 (1965)

36. VOLKHEIMER, G.: Persorption
Gastroenterol. u. Stoffw., Georg-Thieme-Verlag Stuttgart (1972)

37. WASSERMANN u. CITRON: Über die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper
Zschr. Hyg. Infektionskrankh. 50, 332 (1905)

Herrn Prof. Raettig und Dr. Werner danke ich für Themenstellung und Hilfe, insbesondere Frau Lissy und Frau Schubert für ihre liebenswürdige Mitarbeit.

Lebenslauf

Am 29. August 1944 wurde ich, Armin Siegfried Ludwig Büchner, als viertes Kind des Physikers Dr. Artur Büchner und dessen Gattin Elisabeth, geb. Ahlborn, in Halle/Saale geboren. Die ersten Lebensjahre verbrachte ich in Gera, meine Grundschulzeit in Westberlin und Karlsruhe. Seit 1956 besuchte ich das Neue Realgymnasium zu München, wo ich 1965 die Hochschulreife erlangte. Nach einem Jahr Bundeswehrdienst in einer Sanitätseinheit nahm ich zum Wintersemester 1966/67 das Studium der Zahnheilkunde an der Freien Universität Berlin auf und ließ mich nach bestandener zahnärztlicher Vorprüfung im Fach Humanmedizin einschreiben. Seit Juni 1972 bin ich Hospitant des Robert-Koch-Institutes und gedenke, im Anschluß an die ärztliche Prüfung im Wintersemester 1973/74 meine Medizinalassistenz am Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhaus und der Universitäts-Kinderklinik in Berlin zu absolvieren.